

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

UELLE



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : G01N 33/569, 33/552, 33/547, 33/58	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/05965 (43) Date de publication internationale: 12 février 1998 (12.02.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01420 (22) Date de dépôt international: 30 juillet 1997 (30.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/09732 1er août 1996 (01.08.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ DE RECHERCHE ET DE DÉVELOPPEMENT EN ACTIVATION ET COMMUNICATION CELLULAIRE [FR/FR]; Allée H. Pintus, Z.A. Les Nertières, F-06610 La Gaude (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAMSON, Michel [FR/FR]; 30, rue Paul Déroulède, F-06000 Nice (FR). VITTORI, Christian [FR/FR]; 365, chemin des Guerchs, Quartier Notre Dame, F-06330 Roquefort-Les-Pins (FR). ROCHE, Muriel [FR/FR]; 2, rue Jean Vigo, F-06200 Nice (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING EUKARYOTIC CELLS BY FIXING SAID CELLS ON A SUPPORT AND SUPPORT FOR IMPLEMENTING SAID METHOD (54) Titre: METHODE D'IDENTIFICATION DE CELLULES EUKARYOTES PAR FIXATION DESDITES CELLULES SUR UN SUPPORT ET SUPPORT POUR METTRE EN OEUVRE LADITE METHODE (57) Abstract The invention concerns a method for identifying one or more features of eukaryotic cells, in particular of mammals, characterised in that a substantially monocellular layer of a population of eukaryotic cells is covalently immobilised on a functionalised solid support and in that the layer of immobilised cells is subjected to a reaction for determining one cytological and/or cytogenetic feature of said cells and in that the result is evaluated. The invention also concerns a solid support functionalised by a spacer having terminal function capable of reacting with functional groups present in the cell wall. The invention is applicable to the diagnosis of abnormal foetal cells. (57) Abrégé La présente invention concerne une méthode d'identification d'une ou plusieurs caractéristiques de cellules eucaryotes, notamment de mammifères, caractérisée en ce que l'on immobilise de façon covalente une couche substantiellement monocellulaire d'une population de cellules eucaryotes sur un support solide fonctionnalisé et en ce que l'on soumet la couche de cellules immobilisées à une réaction permettant de déterminer une caractéristique cytologique et/ou cytogénétique desdites cellules et en ce que l'on évalue le résultat. L'invention concerne également un support solide fonctionnalisé par un bras espaceur à fonction terminale susceptible de réagir avec des groupements fonctionnels présents sur la paroi cellulaire. Application au diagnostic des cellules fœtales anormales.		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

METHODE D'IDENTIFICATION DE CELLULES EUCARYOTES PAR  
FIXATION DESDITES CELLULES SUR UN SUPPORT ET SUPPORT POUR  
METTRE EN OEUVRE LADITE METHODE

La présente invention concerne une méthode d'identification de  
5 cellules eucaryotes, notamment de mammifères, par simple ou double  
marquage (cytologique et/ou cytogénétique).

La présente invention est applicable à la détermination de  
caractéristiques permettant d'identifier un type particulier de cellules  
présentes éventuellement dans une population hétérogène, par exemple par  
10 réaction immunologique (certaines cellules métastatiques, cellules  
leucocytaires résiduelles lors d'allogreffes etc.).

Elle est également applicable à la détermination d'une  
caractéristique génétique de cellules d'un sujet particulier (par exemple sujet  
porteur du gène de la mucoviscidose, du sida, etc.).

15 La présente invention concerne particulièrement une méthode  
d'identification d'une caractéristique génétique d'une cellule eucaryote,  
notamment de mammifères, en particulier une cellule foetale, à partir d'une  
population hétérogène de cellules eucaryotes.

Elle concerne également un support solide fonctionnalisé destiné  
20 notamment à la mise en oeuvre desdites méthodes.

En ce qui concerne les cellules foetales, de nombreux désordres  
génétiques affectant le foetus sont désormais détectables in utero. Certains de  
ces désordres ont des conséquences extrêmement graves qui pourraient  
rendre désirable pour les parents l'arrêt de la grossesse.

25 Les prélèvements de cellules foetales sont maintenant couramment  
effectués chez les femmes enceintes dites à risque, c'est-à-dire ayant plus de  
38 ans ou appartenant à une famille ayant des antécédents d'anomalies  
génétiques.

Une étude du patrimoine génétique du foetus peut alors être  
30 réalisée sur ces cellules et éventuellement permettre de mettre en évidence  
des trisomies, des translocations ou autres anomalies chromosomiques.

Les techniques de prélèvements des cellules foetales utilisées  
actuellement sont invasives et présentent des risques importants  
d'avortement spontané. En effet, elles nécessitent de perforer les membranes  
35 foetales ou placentaires. C'est le cas notamment de l'amniocentèse, de la  
choriocentèse ou de la cordocentèse.

En outre, bien que l'amniocentèse soit réputée présenter peu de  
risques de complication, elle ne peut être effectuée qu'après la 17ème

semaines d'aménorrhée, soit au second trimestre de grossesse.

Or, il est maintenant clairement établi qu'au cours de la grossesse différents types de cellules foetales telles que les cellules trophoblastiques ou les leucocytes ou les érythroblastes peuvent passer du placenta vers la circulation sanguine périphérique de la mère dès la 6ème semaine.

Il serait donc hautement souhaitable de pouvoir isoler les cellules foetales à partir du sang maternel prélevé par simple prise de sang (ce qui représente une technique non invasive de prélèvement de cellules foetales ne présentant aucun risque d'avortement), pour établir un diagnostic génétique antenatal. Malheureusement, la population foetale circulante est présente avec un pourcentage inférieur à 1 pour 100 000 cellules nucléées dans le sang de la mère.

C'est pourquoi, on a déjà proposé de trier les cellules foetales au moyen d'outils de haute spécificité et de forte affinité, tels que les anticorps.

De nombreux procédés d'enrichissement en cellules foetales d'un échantillon de sang ont donc été proposés.

La demande de brevet EP-A-412 700 décrit une préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques des cellules cytotrophoblastiques du premier trimestre qui peuvent être utilisées dans les diagnostics prénataux (caryotype, identification des polymorphismes de longueur restreinte, liés à des maladies génétiques telles que les thalassémies, l'anémie falciforme, les diabètes insulino-dépendants et la maladie d'Huntington).

Le brevet US 5 432 054 décrit une méthode de séparation d'érythrocytes nucléés foetaux présents dans un échantillon de sang de femme enceinte.

On a également proposé dans la demande de brevet FR-A-2 682 481 un procédé d'obtention de cellules trophoblastiques d'un fœtus permettant l'isolement d'une fraction substantiellement pure en cellules trophoblastiques, voire l'obtention d'un nombre suffisant de cellules trophoblastiques dûment isolées.

Le procédé selon cette demande prévoit une étape de pré-enrichissement en cellules trophoblastiques au moyen d'anticorps anti-leucocytaire commun marquant la majeure partie des leucocytes de la fraction leucocytaire permettant de séparer lesdits leucocytes.

Les méthodes de diagnostic non invasives faisant appel à ces techniques présentent cependant certains inconvénients en ce qui concerne la précision des mesures et en définitive, le diagnostic que le praticien sera amené à faire. On conviendra que dans ce domaine, seule une précision égale

à 100 % peut être acceptable.

On rappellera que ces méthodes de diagnostic antenatales non invasives font appel à des techniques de marquage permettant de repérer d'une part les cellules foetales et d'autre part les caractéristiques génétiques particulières qu'il s'agit d'identifier (technique du double marquage).

5 La demande de brevet WO-A-94/02646 concerne une méthode d'identification de cellules foetales par hybridation de l'acide nucléique des cellules foetales.

10 Les cellules foetales sont fixées sur un support solide par précipitation ou pontage. D'une part la précipitation implique un séchage, ce qui abîme les cellules dans de nombreux cas. D'autre part, le pontage entre cellules (crosslinking) réduit l'efficacité de l'hybridation comme indiqué page 22, ligne 28 à page 23, ligne 3.

15 La demande de brevet EP-A-396 116 est relative à des microsphères fonctionnalisées reliées par un bras hétérobifonctionnel à une protéine.

La demande de brevet WO-A-94/02830 décrit également la fixation par adsorption de cellules (cytocentrifugation) comme indiqué page 9, lignes 15-17.

20 La demande de brevet WO-A-96/03632 décrit une méthode de détection de cellules qui sont mises en suspension.

La présente invention propose une nouvelle méthode d'identification de cellules allant à l'encontre de celles précédemment décrites. Les inventeurs ont en effet mis en évidence que le problème en cause pouvait être résolu de façon satisfaisante sans qu'il soit nécessaire de purifier les cellules à identifier. Cette méthode, bien que particulièrement intéressante dans le cas du double marquage peut également être appliquée aux techniques d'identification par simple marquage.

25 C'est pourquoi, l'objet de la présente invention est en général de proposer une nouvelle méthode de diagnostic simple et fiable, permettant la détection d'une caractéristique d'une cellule eucaryote par simple ou double marquage, tout en évitant les différents inconvénients cités ci-dessus.

Un autre objet de la présente invention est de proposer une méthode de diagnostic antenatal non invasive qui procure des résultats nets avec un pourcentage de réussite proche de 100 %.

35 Un autre objet de la présente invention est de proposer des supports solides permettant de mettre en oeuvre ladite méthode de diagnostic.

L'invention concerne en premier lieu une méthode d'identification d'au moins une caractéristique d'une cellule eucaryote,

notamment de mammifères, caractérisée en ce que l'on immobilise de façon covalente une couche substantiellement monocellulaire d'une population de cellules eucaryotes sur un support solide fonctionnalisé et en ce que l'on soumet la couche de cellules immobilisées, à une réaction permettant de déterminer une caractéristique cytologique et/ou cytogénétique et en ce que l'on évalue le résultat.

Avantageusement, le support est plan.

Pour éviter de purifier les cellules trophoblastiques, on aurait pu envisager d'adsorber l'échantillon de cellules, éventuellement triées, sur une lame de verre par exemple, afin de mettre en oeuvre les méthodes de diagnostic sur la couche de cellules obtenues.

Cependant, il est nécessaire dans ce cas de prévoir une étape de séchage afin d'immobiliser ces cellules sur la lame. En effet, sans cette étape de séchage, les cellules sont détachées par les différentes étapes de lavage, ce qui rend la méthode inopérante. Malheureusement, l'étape de séchage dans de nombreux cas, abime ces cellules.

La méthode de diagnostic selon l'invention assure une immobilisation des cellules sur un support solide plan tout en évitant les inconvénients décrits ci-dessus.

Le support solide est de préférence de nature minérale (verre par exemple) bien que des supports organiques puissent également convenir.

Le support solide est fonctionnalisé par un bras espaceur à fonction terminale susceptible de réagir avec des groupements fonctionnels présents sur la paroi cellulaire.

Les groupements présents sur la paroi cellulaire sont notamment les groupements thiol, carboxyle ou amino primaire situés sur la partie protéique. Ces groupements réagissent, après activation éventuelle, avec la fonction terminale appropriée de la chaîne.

Les groupements peuvent également être présents sur la partie sucre associée aux protéines, tels que les groupements hydroxyle, transformés de manière connue en groupements aldéhyde réactifs.

Les fonctions terminales réactives permettront d'assurer une liaison covalente avec lesdits groupements réactifs dans des conditions appropriées :

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement thiol ou un pont disulfure (ce dernier sera préalablement réduit), la fonction terminale est un radical maléimido, iodoacétyle, dithio-pyridyle ;

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement amino

primaire, la fonction terminale est un radical aldéhyde, carboxylate activé, N-hydroxysuccinimide,  $\alpha$ -dibromo ;

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement carboxylate activé (notamment avec des carbodiimides), la fonction terminale est une amine primaire ou secondaire ;

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement hydroxyle, la fonction terminale est un radical hydroxysuccinimide, carboxylate activé ;

- lorsque le groupement fonctionnel est l'arginine, la fonction terminale est le glyoxal.

Selon une variante préférée, le groupement fonctionnel est un groupement thiol et la fonction terminale est un radical maléimido.

De préférence le support solide est de nature minérale, par exemple le verre, et le bras espaceur est attaché à l'extrémité opposée à ladite fonction terminale par l'intermédiaire des fonctions silanols du support solide.

La liaison covalente entre le verre et le bras espaceur est assurée notamment par la réaction d'un groupement  $\text{Si}(\text{OR}_1)-$  avec un radical silanol du verre d'une manière connue,  $\text{OR}_1$  étant un groupement susceptible d'être hydrolysé.

De préférence  $\text{R}_1$  est un radical  $(\text{C}_1-\text{C}_8)$  alkyle et avantageusement  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$  alkyle.

De préférence, le bras espaceur est constitué par une chaîne divalente terminée à ses extrémités d'une part par la fonction terminale et d'autre part par  $\text{Si}(\text{OR}_1)_3$ .

La chaîne divalente est avantageusement hydrocarbonée comportant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, éventuellement ramifiés, éventuellement insaturés. Elle ne présente essentiellement pas d'affinité vis-à-vis du support dans une variante selon l'invention. Cela permet de limiter les interactions non spécifiques avec le support.

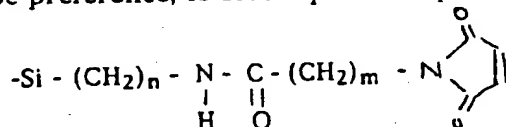
Le bras espaceur comprendra avantageusement 8 à 30 atomes et répondra à la formule :

- Si -  $\text{R}_2$  - fonction terminale

R<sub>2</sub> étant une chaîne hydrocarbonée de 8 à 30 atomes comportant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, éventuellement ramifiée, éventuellement insaturée.

De préférence, le bras espaceur répond à la formule :

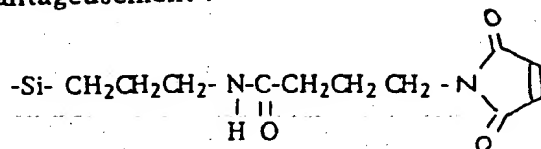
5



n, m indépendamment l'un de l'autre étant un nombre entier positif inférieur ou égal à 10, de préférence inférieur ou égal à 5.

10

Avantageusement :



15

Un procédé pour fonctionnaliser le support solide consiste à le silaniser à l'aide d'un oméga-aminoalkyltrialcoxy silane de formule (R<sub>1</sub>O)<sub>3</sub>Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> étant un radical alkyle de C<sub>1</sub> à C<sub>8</sub>, préférentiellement C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub>, puis à faire réagir le support greffé obtenu avec une chaîne divalente munie à une extrémité d'une fonction réactive vis-à-vis du radical amino et à l'autre extrémité d'une fonction réactive (fonction terminale) vis-à-vis du groupement fonctionnel présent sur la cellule.

20

De préférence, le support solide est fonctionnalisé par silanisation à l'aide de 3-aminopropyltrialcoxy silane puis réaction subséquente avec l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide γ-maléimido butyrique.

25

Le support solide fonctionnalisé ainsi obtenu est lavé avec un tampon de couplage adapté à la réaction considérée.

Selon une variante, la méthode dite de simple marquage est caractérisée en ce que la population de cellules eucaryotes est choisie dans le groupe constitué par :

30

- la population de cellules susceptibles de comprendre des cellules métastatiques,

- la population de cellules issues de préparation de moelle osseuse lors d'allogreffes susceptible de contenir des cellules leucocytaires résiduelles,

35

- la population de cellules susceptible de contenir des bactéries circulantes,

et en ce qu'on marque les cellules à identifier avec un marqueur spécifique



desdites cellules à identifier.

Selon une variante, la méthode dite de simple marquage est caractérisée en ce que la population de cellules eucaryotes est choisie dans le groupe constitué par :

- 5           - la population de cellules susceptibles de contenir des cellules ayant une caractéristique génétique anormale,

et en ce que l'on soumet la couche de cellules immobilisées à une réaction cytogénétique permettant de révéler la caractéristique génétique à identifier.

- 10           Selon une autre variante, la méthode d'identification de double marquage est caractérisée en ce qu'un échantillon de cellules prélevées sur un individu est soumis aux réactions suivantes :

a) on immobilise de façon covalente les cellules eucaryotes sur un support fonctionnalisé,

- 15           b) on perméabilise éventuellement les cellules immobilisées,

c) on marque les cellules à identifier avec un marqueur spécifique desdites cellules à identifier,

- d) on soumet la couche de cellules immobilisées à une réaction cytogénétique permettant de révéler la caractéristique génétique à identifier,

20           e) on évalue le résultat.

- Il est souhaitable, afin d'enrichir l'échantillon en cellules à détecter, d'effectuer préalablement à l'étape a) un tri cellulaire dudit échantillon pour obtenir une fraction enrichie en cellules eucaryotes à identifier. Dans le cas d'un échantillon sanguin, les cellules anuclées représentent plus de 99 % des cellules sanguines circulantes et bloquent la fixation des cellules nucléées sur le support activé.

- Dans le cas des cellules foetales, cette opération est d'autant plus nécessaire que la population foetale circulante est présente avec un pourcentage inférieur à 1 pour 100 000 cellules nucléées dans le sang de la mère.

- Cette élimination peut être effectuée de manière connue par tri négatif, notamment par centrifugation sur gradient de densité, par exemple selon la méthode FICOLL® dans le cas des cellules sanguines. On rappellera que le FICOLL® est un polymère de saccharose dont l'utilisation pour purifier des cellules mononuclées sanguines est parfaitement normalisé. Des solutions de FICOLL®, de densités précalibrées, sont disponibles commercialement et s'emploient sous la forme de coussins, de gradients de densité discontinue ou

de gradients de densité continue, sur lesquels sont séparées les cellules sanguines.

Par ailleurs, les cellules sont de préférence lavées intensivement afin d'éliminer la majeure partie des protéines contaminantes provenant du milieu dans lequel elles se trouvaient initialement, le sang notamment.

Les cellules sont mises en suspension dans du tampon de couplage à une concentration qui, usuellement, varie entre  $10^5$  à  $10^7$  cellules/ml bien que cet intervalle ne soit pas critique, étalées sur le support fonctionnalisé et stockées en chambre humide à température appropriée, notamment ambiante, pendant une durée déterminée, une heure par exemple, pour permettre aux cellules de sédimenter et de former une liaison covalente avec la fonction terminale du bras espaceur. Le support est alors rincé pour achever la fixation des cellules qui n'auraient pas encore réagi et éliminer les cellules qui ne sont pas liées de façon covalente.

Après l'immobilisation covalente des cellules, il est avantageux de les fixer par exemple par traitement avec du paraformaldéhyde, lavage puis neutralisation des fonctions aldéhydiques résiduelles.

La perméabilisation, si nécessaire, est effectuée de manière connue, notamment par traitement avec du Triton X100® par exemple. Cette perméabilisation est notamment utile dans le cas des motifs antigéniques intracellulaires.

Le marqueur spécifique est un anticorps substantiellement spécifique desdites cellules à identifier associé à une substance capable d'être repérée par un moyen approprié.

Le marquage membranaire doit être compatible avec la méthode selon l'invention qui fait appel au double marquage.

On a constaté que les anticorps spécifiques qui portent directement des produits chromophores tels qu'un groupement chimique fluorescent (fluorescéine) ne convenaient pas dans le cadre de la présente invention car le signal fluorescent disparaissait après l'étape de dénaturation ultérieure nécessaire à l'hybridation. C'est le cas, notamment des anticorps anti-cellules trophoblastiques.

Par cellules "trophoblastiques" au sens de la présente invention, on entend toute cellule du trophoblaste, syncytiotrophoblaste ou cytotrophoblaste d'origine villeuse ou extravilleuse quel que soit son type, anuclée, mononuclée, polynuclée et quelle que soit l'époque de leur apparition dans le sang maternel par rapport à la durée de la gestation.

On a trouvé que le procédé de marquage au moyen de la

phosphatase alcaline permettait une identification satisfaisante des cellules. Cela nécessite une révélation subséquente de cette enzyme par un substrat approprié qui par réaction avec l'enzyme conduira à une visualisation.

Dans ce cas, ladite substance est un conjugué couplé à la phosphatase alcaline et on révèle le marqueur au moyen d'un substrat chromogène.

Par exemple, le substrat de révélation dénommé "Fast Red", hydrolysé par la phosphatase alcaline (PA) donne un précipité insoluble rose-rouge visualisable avec un filtre dichroïque et en optique.

Selon cette variante, l'anticorps spécifique est fixé sur les cellules puis on met en contact les cellules avec un anticorps anti-anticorps spécifique des cellules, couplé à la phosphatase alcaline.

Parmi les anticorps anti-cellules trophoblastiques retenus on utilisera avantageusement un anticorps du type GB 17, GB 25 développés par Aster Biotechnologies. Ces deux types d'anticorps présentent une spécificité stricte restreinte à ces seules cellules. Il est possible cependant d'envisager l'emploi d'un troisième anticorps, un anti-cytokératine 18. Bien que non spécifique des trophoblastes, celui-ci a été développé contre les kératinocytes, il ne donne pas de réaction croisée avec les cellules sanguines. Les anticorps seront associés par un épitope à un anticorps spécifique des chaînes lourdes et légères desdits anticorps anti-cellules trophoblastiques, couplé à la phosphatase alcaline (GAM-PA).

Selon un mode de réalisation, une saturation des cellules est effectuée avec un tampon approprié. Après quoi, l'anticorps monoclonal spécifique est incubé à la concentration appropriée pendant une durée déterminée, une heure par exemple, en chambre humide et à température ambiante. Puis le deuxième anticorps, couplé à la phosphatase alcaline, et pouvant se conjuguer à un épitope de l'anticorps spécifique, est laissé en incubation dans des conditions similaires audit anticorps spécifique.

Les techniques de lavage sont utilisées de manière connue au cours et après la procédure de marquage à la phosphatase par exemple avec le tampon TBS.

La révélation de l'enzyme phosphatase alcaline est effectuée par incubation des lames durant une durée de l'ordre de 30 minutes avec un tampon tel que le Tris dans lequel a été ajouté le substrat de révélation. De préférence, celui-ci contient le "Fast Red" qui hydrolysé par la phosphatase alcaline donne un précipité insoluble rose rouge visualisable avec un filtre dichroïque et en optique. Après l'incubation les lames sont lavées au TBS.

Selon un mode de réalisation préféré, la révélation avec le substrat chromogène est effectuée en présence d'un inhibiteur des phosphatases alcalines endogènes tel que le levamisole.

En effet, en absence d'un tel inhibiteur, un bruit de fond résiduel est observé en raison de la présence de phosphatases alcalines endogènes toujours actives.

A partir d'une concentration en levamisole de 5 mM, le bruit de fond est suffisamment diminué pour ne pas affecter l'intensité du signal positif. Il est souhaitable, de plus, de choisir un temps de révélation suffisamment court de l'ordre d'une dizaine de minutes usuellement entre 5 et 15 minutes. La dilution de l'anticorps couplé à la phosphatase alcaline doit être avantageusement comprise entre 1/60ème et 1/480ème afin d'obtenir un signal optimal. Néanmoins, cet intervalle varie selon les anticorps. La dilution optimale d'un anticorps de deuxième couche, conjugué à une enzyme (phosphatase alcaline ou autre), va dépendre de la concentration à laquelle il se trouve dans la solution mère. Cette dilution sera optimisée par des manipulations à la portée de l'homme du métier.

La technique d'hybridation in situ permet la détection rapide de défauts cytogénétiques. Cette technique utilise généralement une sonde fluorescente et est connue sous l'appellation FISH (en anglais : fluorescence in situ hybridization). Cette technique utilise des sondes spécifiques d'un chromosome associé à un marqueur pour permettre l'identification d'aberrations chromosomiques en nombre comme en structure.

On peut utiliser de façon générale un marquage chaud (radioactif) ou froid (enzyme ou radical biotinyne).

Cette méthode est utilisée avec succès pour le diagnostic des trisomies. Une méthode de diagnostic de la trisomie 18 a été utilisée avec succès avec une sonde de séquences répétitives et spécifique de la région centromérique du chromosome 18. De même, les sondes ADN qui marquent spécifiquement la bande terminale 21q 22.3 permet par hybridation in situ une détection rapide du nombre d'aberrations du chromosome 21 ainsi que de la structure de ces aberrations.

En général, l'hybridation in situ peut être appliquée directement aux cellules foetales isolées du sang maternel et sont disponibles pour les chromosomes 18, X et Y ainsi que pour les deux chromosomes 13 et 21.

Bien entendu, la méthode selon l'invention n'est pas limitée à l'application aux cellules foetales, notamment trophoblastiques circulant dans le sang maternel, mais s'étend au contraire à la détection d'autres

cellules eucaryotes, par exemple :

- recherche et identification de cellules métastiques non seulement dans le sang, mais également dans d'autres liquides physiologiques tels que la lymphe,

5           - recherche de cellules leucocytaires résiduelles dans les préparations de moelle osseuse lors d'allogreffes,

          - analyse fine d'anomalies génétiques ou détection de la présence d'ADN étranger par amplification génique (PCR) *in situ*, sur cellules fixées (cette technique est actuellement difficilement réalisable sur lame en raison  
10 de la perte cellulaire importante qui se produit au cours du processus). Cette dernière application présente un intérêt primordial dans le dépistage précoce du sida chez des patients séronégatifs au stade de primo-infection ou chez des enfants nés de mères séropositives, et également dans l'exploration des séronégativations (disparition des anticorps alors que le processus  
15 infectieux est toujours présent).

Toujours dans le cadre de cette pathologie, le modèle pourrait être applicable au dépistage cellulaire et non plus sérologique, de l'antigène P24/P25 (dépistage immunologique de la protéine ou de son ARNM<sub>m</sub> par TR-PCR),

20           - recherche et identification de bactéries circulantes.

Toutes les techniques relatives à l'hybridation *in situ* peuvent être utilisées dans le cadre de la présente invention.

Il existe sur le marché des sondes qui sont directement couplées à des fluorochromes. Elles génèrent en général des signaux de faible intensité  
25 après hybridation. On leur préfère actuellement deux autres types de sondes :

- des sondes qui sont conjuguées à de la biotine ; la révélation est réalisée alors avec de l'avidine ou avec un anticorps antibiotine, conjugués à un fluorochrome (fluorescéine ou rhodamine).

30           - des sondes qui sont conjuguées à la digoxigénine et que l'on révèle après hybridation avec des anticorps anti-digoxigénine conjugués à un fluorochrome.

Cette méthode d'identification dite de double marquage trouve une application particulièrement avantageuse dans le cas de la détection d'anormalité chromosomique des cellules foetales et permet une détection de  
35 celles-ci dans les premiers mois de la grossesse avec une résolution particulièrement nette et un pourcentage de réussite très élevé approchant 100%.

L'invention concerne donc en particulier une méthode de diagnostic antenatal comprenant les étapes suivantes :

a) on prélève un échantillon de sang du système de circulation périphérique de la mère portant le fœtus,

5 b) on élimine les érythrocytes dudit échantillon par tri négatif,

c) on immobilise de façon covalente la fraction leucocytaire sur le support solide fonctionnalisé précédemment décrit,

d) on perméabilise éventuellement les cellules immobilisées,

10 e) on marque les cellules à identifier avec un marqueur spécifique des cellules trophoblastiques,

f) on soumet la couche de cellules immobilisées à une méthode d'analyse cytogénétique permettant de révéler la caractéristique génétique à identifier,

g) on évalue le résultat.

15 Les différentes variantes décrites ci-dessus sont comprises dans la méthode de diagnostic antenatale indiquée. De préférence, l'étape f) consiste à mettre en contact la couche de cellules immobilisées avec une sonde marquée complémentaire spécifique de la caractéristique génétique à identifier.

20 De préférence, le marqueur spécifique est un anticorps monoclonal associé à une substance couplée à la phosphatase alcaline.

Lors de la révélation, il est avantageux de mettre la fraction leucocytaire immobilisée en présence d'un inhibiteur de phosphatase alcaline endogène tel que le levamisole à une concentration de préférence  
25 comprise entre 1 et 5 mM.

Au-delà de 5 mM, le levamisole inhibe également la phosphatase alcaline d'origine intestinale couplée aux anticorps.

Il existe également un inhibiteur utilisé moins couramment, le tripeptide phénylalanine-glycine-glycine.

30 Les anticorps monoclonaux sont de préférence choisis dans le groupe constitué par le GB17 ou le GB25.

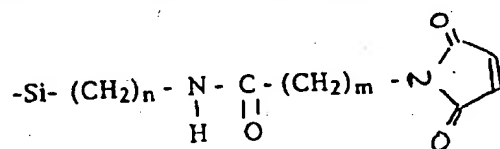
La sonde marquée complémentaire est de préférence spécifique de la région centrométrique du chromosome 18 ou de la bande terminale 21q22.3 du chromosome 21.

35 Selon une variante avantageuse, les cellules sont fixées, après immobilisation covalente sur le support solide, par tout moyen approprié, notamment par traitement avec du paraformaldéhyde.

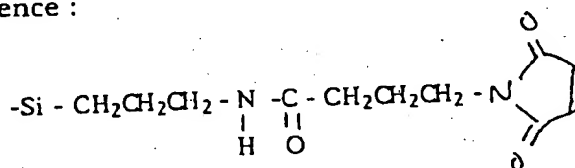
L'invention concerne donc également un support solide fonctionnalisé de façon covalente par un bras espaceur à fonction terminale susceptible de réagir avec des groupements fonctionnels présents sur la paroi cellulaire tel qu'il vient d'être décrit précédemment.

De préférence, le support est de nature minérale et est attaché au bras espaceur par l'intermédiaire des radicaux silanols du support.

Bien que toutes les variantes décrites précédemment sont comprises dans la définition du présent support fonctionnalisé, avantageusement le bras espaceur répond à la formule :



n, m indépendamment l'un de l'autre étant un nombre entier positif inférieur ou égal à 10, de préférence inférieur ou égal à 5, et de préférence :



#### MODE OPERATOIRE

##### Préparation du support fonctionnalisé

Les supports sont des lames de verre utilisées en microscopie.

Les lames sont placées dans un bain contenant de l'HCL 12N et de l'éthanol (lv: 9v). Après une heure de trempage à température ambiante, les lames sont rincées à l'eau et séchées à 37°C.

Ce traitement a pour effet de nettoyer les lames et de générer les silanol (Si-OH) sur leur surface.

Après rinçage à l'eau distillée, séchage à 200°C, les lames sont mises à tremper dans du toluène à reflux contenant 5 % d' amino ou de thiosilane et maintenues à reflux pendant 16 h. Pour cette étape, on utilise préférentiellement de l'aminopropyl triethoxysilane. Les lames sont rincées successivement avec du toluène et de l'éthanol, puis séchées avant stockage. Les lames peuvent être utilisées immédiatement ou séchées et stockées à l'abri de la poussière.

Cette étape peut être évitée en utilisant des lames présilanisées disponibles commercialement.

Les lames silanisées sont rincées dans du tampon phosphate de sodium 100 mM, NaCl 50 mM, pH 6.8 (tampon de couplage).

5 Une solution de l'ester n-hydroxysuccinimide de l'acide  $\gamma$ -maleimido butyrique (GMBS)(200 mg/ml) est préparée extemporanément dans du N,N-diméthylformamide ou du DMSO puis diluée au 1:30 dans du tampon de couplage.

Les lames de microscopes sont recouvertes de 200  $\mu$ l de cette solution, d'une lamelle, et incubées pendant 2 heures à température ambiante en chambre humide.

10 Les lames sont lavées avec du tampon de couplage (2 bains de 10 minutes à température ambiante).

Les lames de microscopes sont alors immédiatement utilisées comme support pour fixer les cellules.

#### 15 Immobilisation covalente des cellules

Un échantillon de sang est prélevé sur la circulation veineuse périphérique d'une femme enceinte à 9 semaines d'aménorrhée.

20 Par tri négatif, les érythrocytes sont séparés et la fraction enrichie en leucocytes est lavée intensivement afin d'éliminer la majeure partie des protéines contaminantes provenant du sang.

25 Les cellules sont mises en suspension dans du PBS (NaCl 134 mM, KCl 2,6 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,46 mM), à une concentration de 1,5 à 2,5  $10^6$  cellules/ml. Cette suspension (200  $\mu$ l) est étalée sur une lame à l'aide d'une pointe de pipetman et stockée en chambre humide à température ambiante pendant 1 heure pour permettre aux cellules de sédimenter et de former des liaisons thioether avec le GMBS.

Les lames sont finalement rincées avec du PBS protéiné pour bloquer les groupements maléimyl qui n'auraient pas réagi et éliminer les cellules qui ne sont pas liées covalamment.

30 La densité surfacique des cellules est de l'ordre de 2500 cellules/ $\text{mm}^2$ .

Après élimination du tampon de couplage, les cellules liées covalamment au support sont rincées avec du PBS (NaCl 134 mM, KCl 2,6 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,46 mM) puis fixées en les incubant pendant 17 min  
35 à 20°C dans du paraformaldéhyde (PFA) en solution à 2 % dans du PBS.



Les lames sont rincées dans du PBS et le PFA résiduel est neutralisé par un bain de 15 min à 20°C dans du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en solution à 50 mM dans du PBS (pH 7,2).

#### 5 Identification des cellules foetales

Après rinçage des lames dans du PBS (5min à 20°C), les cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 (0,1 % dans du PBS ; 4 min d'incubation à 4°C).

10 Après 3 lavages de 10 min à 20°C avec du tampon PBS, les lames sont saturées pendant 10 min à température ambiante avec du sérum de chèvre dilué à 10 % dans du tampon TBS (NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM rouge de phénol 0,042 mM, Tris 25 mM pH 7,4).

Les cellules sont ensuite incubées pendant 16 h à 4°C avec les anticorps suivants :

- 15 - GB 17 (syncytiotrophoblastes)
- GB 25 (syncytio+cytotrophoblastes)
- anti-cytokératine 18 (syncytio + cytotrophoblastes)
- anti-hémoglobine foetale (érythroblastes)
- anti-récepteur de la transferrine CD 71 (érythroblastes)

20 utilisés seuls ou de préférence en combinaison en solution dans du tampon TBS contenant 10 % de sérum de chèvre.

Après lavage, les cellules sont incubées (1h à température ambiante avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris conjugués à la phosphatase alcaline.

25 Les complexes immunoenzymatiques sont révélés en utilisant comme substrat de la phosphatase alcaline du fast red amené en solution dans du tampon Tris/HCl 100 mM pH 8,2 contenant un inhibiteur des phosphatases alcalins endogènes (on utilise de préférence du levamisole à une concentration de 5 mM). L'hydrolyse des phosphates est poursuivie pendant  
30 20 min à 20°C.

#### Détermination cytogénétique

Après les avoir rincées avec du PBS, les cellules sont post-fixées avec du PFA dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Les cellules sont alors incubées à 50°C pendant 3 bains successifs de tampon 2 SSC (NaCl 0,3 M, citrate de sodium 0,06 M pH 7,2) contenant du Tween 20 à 0,05 % avant de subir une déshydratation progressive dans des bains successifs, d'éthanol à 70, 80 et 100 %.

5 L'ADN cellulaire est ensuite dénaturé en incubant les lames pendant 8 min à 70°C dans du tampon 2 SSC contenant 70 % de formamide. Les lames sont ensuite déshydratées à l'éthanol comme décrit précédemment.

Parallèlement, les sondes chromosomiques (chromosome Y : DYZ1/DYZ<sub>3</sub> biotinylée ; chromosome X : DXZ1, digoxigeninylées) sont  
10 dénaturées à 70°C (10 min d'incubation) et stockées à 4°C avant d'être déposées (séparément ou en combinaison) sur les cellules entre lames et lamelles scellées au latex.

L'hybridation des sondes à l'ADN cellulaire est poursuivie pendant  
16 h à 37°C.

15 Après rinçage des lames par 3 bains successifs dans du tampon 2SSC et saturation avec une solution protéinée (2 SSC contenant 1 % d'albumine bovine ou 5 % de lait écrémé en poudre), les sondes (utilisées de préférence sous forme biotinylées et digoxigéninylées), hybridées à l'ADN cellulaire sont révélées respectivement avec de l'avidine et des anticorps  
20 antidigoxigénine conjugués à des fluorochromes (par exemple de la fluorescéine).

Les cellules sont finalement rincées, recouvertes d'un milieu de montage contenant du DAPI (0,3 µg/ml) pour contrecolorer les noyaux et d'une lamelle, puis examinées en microscopie à fluorescence.

### REVENDICATIONS

1. Méthode d'identification d'au moins une caractéristique d'une cellule eucaryote, notamment de mammifères, caractérisée en ce que l'on immobilise de façon covalente une couche substantiellement monocellulaire d'une population de cellules eucaryotes sur un support solide fonctionnalisé et en ce que l'on soumet la couche de cellules immobilisées, à une réaction permettant de déterminer une caractéristique cytologique et/ou cytogénétique et en ce que l'on évalue le résultat.

2. Méthode d'identification selon la revendication 1, caractérisée en ce que les cellules sont immobilisées de façon covalente sur un support solide plan fonctionnalisé, de nature minérale.

3. Méthode d'identification selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le support solide est fonctionnalisé par un bras espaceur à fonction terminale susceptible de réagir avec des groupements fonctionnels présents sur la paroi cellulaire.

4. Méthode d'identification selon la revendication 3, caractérisée en ce que le support solide est en verre et le bras espaceur est attaché à l'extrémité opposée à ladite fonction terminale par les fonctions silanols du support solide.

5. Méthode d'identification selon la revendication 3, caractérisée en ce que :

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement thiol ou un pont disulfure (préalablement réduit), la fonction terminale est un radical maléimido, iodoacétyle, dithio-pyridyle.

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement amino primaire, la fonction terminale est un radical aldéhyde, carboxylate activé, N-hydroxysuccinimide,  $\alpha$ -dibromo,

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement carboxylate activé (notamment avec des carboimides), la fonction terminale est une amine primaire ou secondaire,

- lorsque le groupement fonctionnel est un groupement hydroxyle, la fonction terminale est un radical N-hydroxy succinimide, carboxylate activé,

- lorsque le groupement fonctionnel est l'arginine, la fonction terminale est le glyoxal.

6. Méthode d'identification selon la revendication 3, caractérisée en ce que le bras espaceur comporte une chaîne divalente hydrocarbonée comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, éventuellement

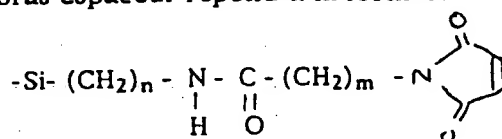
ramifiée, éventuellement insaturée.

7. Méthode d'identification selon la revendication 6, caractérisée en ce que le bras espaceur répond à la formule :

5                    - Si - R<sub>2</sub> - fonction terminale

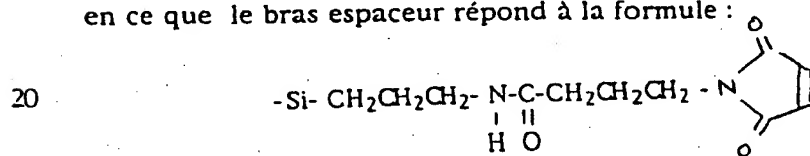
R<sub>2</sub> étant une chaîne hydrocarbonée de 8 à 30 atomes comportant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, éventuellement ramifiée, éventuellement insaturée.

10                  8. Méthode d'identification selon la revendication 7, caractérisée en ce que le bras espaceur répond à la formule :



15                  n, m indépendamment l'un de l'autre étant un nombre entier positif inférieur ou égal à 10.

9. Méthode d'identification selon la revendication 8, caractérisée en ce que le bras espaceur répond à la formule :



10. Méthode d'identification selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la population de cellules eucaryotes est choisie dans le groupe constitué par :

25                    - la population de cellules susceptibles de comprendre des cellules métastatiques,

                     - la population de cellules issues de préparation de moelle osseuse, lors d'allogreffes, susceptibles de contenir des cellules leucocytaires résiduelles,

30                    - la population de cellules susceptibles de contenir des solutions des bactéries circulantes,  
et en ce que l'on marque les cellules à identifier avec un marqueur spécifique desdites cellules à identifier.

11. Méthode d'identification selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la population de cellules eucaryotes est choisie dans le groupe constitué par

                     - la population de cellules susceptibles de contenir des cellules

ayant une caractéristique génétique anormale, et en ce que l'on soumet la couche de cellules fixées à une réaction cytogénétique permettant de révéler la caractéristique génétique à identifier.

12. Méthode d'identification selon l'une des revendications 1 à 9, d'une caractéristique génétique d'une cellule eucaryote, notamment de mammifères, à partir d'une population hétérogène de cellules eucaryotes, caractérisée en ce qu'un échantillon de cellules prélevées sur un individu est soumis aux réactions suivantes :

- a) on immobilise de façon covalente les cellules eucaryotes sur un support fonctionnalisé,
- b) on perméabilise éventuellement les cellules immobilisées,
- c) on marque les cellules à identifier avec un marqueur biologique spécifique desdites cellules à identifier,
- d) on soumet la couche de cellules immobilisées à une réaction cytogénétique permettant de révéler la caractéristique génétique à identifier,
- e) on évalue le résultat.

13. Méthode d'identification selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'avant l'étape a) on effectue un tri pour obtenir une fraction enrichie en cellules eucaryotes.

14. Méthode d'identification selon la revendication 10 ou 12, caractérisée en ce que le marqueur spécifique est un anticorps substantiellement spécifique desdites cellules à identifier, associé à une substance capable d'être repérée par un moyen approprié.

15. Méthode d'identification selon la revendication 14, caractérisée en ce que la substance est un conjugué couplé à la phosphatase alcaline et on révèle le marqueur au moyen d'un substrat chromogène.

16. Méthode d'identification selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que les cellules immobilisées de façon covalente au support sont fixées par un moyen approprié, notamment le paraformaldéhyde.

17. Méthode d'identification selon la revendication 16, caractérisée en ce que la réaction cytogénétique consiste à mettre en contact la couche de cellules immobilisées et fixées avec une sonde marquée complémentaire spécifique de la caractéristique génétique à identifier.

18. Méthode d'identification selon la revendication 17, caractérisée en ce que la sonde est radio-active ou attachée à une enzyme ou à un radical biotinyle ou digoxigénine.

19. Méthode d'identification selon la revendication 12, caractérisée en ce que les cellules à identifier sont choisies dans le groupe constitué par les cellules trophoblastiques.

5 20. Méthode d'identification selon l'une des revendications 12 à 19, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au diagnostic antenatal et en ce qu'un échantillon de sang du système de circulation périphérique d'une femme enceinte, est soumis aux étapes suivantes :

a) on élimine les érythrocytes dudit échantillon notamment par tri négatif,

10 b) on immobilise de façon covalente la fraction leucocytaire sur le support solide fonctionnalisé selon les revendications 2 à 9,

c) éventuellement on perméabilise les cellules,

d) on marque les cellules à identifier avec un marqueur spécifique des cellules trophoblastiques,

15 e) on soumet la couche de cellules immobilisées à une méthode d'analyse cytogénétique permettant de révéler la caractéristique génétique à identifier,

f) on évalue le résultat.

20 21. Méthode d'identification selon la revendication 20, caractérisée en ce que le marqueur spécifique est un anticorps monoclonal.

22. Méthode d'identification selon la revendication 20 ou 21, caractérisée en ce que le marqueur spécifique est associé à une substance capable d'être repérée par un moyen approprié, notamment un conjugué couplé à la phosphatase alcaline.

25 23. Méthode d'identification selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'on met en présence la fraction leucocytaire avec un inhibiteur de phosphatase alcaline endogène, lors de la révélation au moyen du substrat chromogène.

30 24. Méthode d'identification selon la revendication 23, caractérisée en ce que l'inhibiteur de phosphatase alcaline endogène est le levamisole.

25. Méthode d'identification selon la revendication 23 ou 24, caractérisée en ce que la concentration en inhibiteur de phosphatase alcaline endogène est comprise entre 1 et 5 mM.

35 26. Méthode d'identification selon la revendication 21, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est choisi dans le groupe constitué par le GB17, GB25 ou un anti-cytokératine 18.

27. Méthode d'identification selon la revendication 20,

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No  
PCT/FR 97/01420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 G01N33/569 G01N33/552 G01N33/547 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 02646 A (RES DEV FOUNDATION ;ASGARI MORTEZA (US); PRASHAD NAGINDRA (US); CU) 3 February 1994 cited in the application see page 4, line 14 - line 18 see page 5, line 9 - line 11 see page 9, line 1 - line 4 see page 22, line 28 - line 30; claims 1,4,5,47	1-7, 10-30
Y	EP 0 396 116 A (ABBOTT LAB) 7 November 1990 cited in the application see the whole document	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 1997

Date of mailing of the international search report

05. 11. 97

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cartagena y Abella, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01420

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 02830 A (CANCER RES INST ;GREAVES MELVYN (GB); PRICE CATHERINE MARY (GB); C) 3 February 1994 cited in the application see claims 1,5,8,11 ---	1-30
Y	WO 96 03632 A (UNIV COLUMBIA) 8 February 1996 cited in the application see page 1, line 19 - line 34 see page 13, line 15 - line 32; claims 1,2,9-11,15 ---	1-30
A	WO 92 21769 A (ABBOTT LAB) 10 December 1992 see page 14, line 39 - page 20, line 14 see page 23, line 12 - line 21 ---	1-9
A	WO 93 07486 A (PARTICULIERE DE SAINT CYR SOC) 15 April 1993 cited in the application see page 15, line 5 - line 12 & FR 2 682 481 A ---	1,6
A	WO 92 18868 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 29 October 1992 see claims 36,37 -----	8,9



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01420

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9402646 A	03-02-94	AU 4685593 A CA 2140278 A EP 0662152 A JP 7509136 T US 5629147 A	14-02-94 03-02-94 12-07-95 12-10-95 13-05-97
EP 0396116 A	07-11-90	CA 2015938 A DE 69029873 D DE 69029873 T ES 2099699 T JP 2304364 A US 5399501 A	02-11-90 20-03-97 07-08-97 01-06-97 18-12-90 21-03-95
WO 9402830 A	03-02-94	NONE	
WO 9603632 A	08-02-96	US 5648222 A AU 3154295 A	15-07-97 22-02-96
WO 9221769 A	10-12-92	EP 0586590 A JP 6508210 T	16-03-94 14-09-94
WO 9307486 A	15-04-93	FR 2682481 A AU 2893792 A	16-04-93 03-05-93
WO 9218868 A	29-10-92	AU 1772992 A CA 2107894 A EP 0585310 A JP 6506688 T NO 933581 A US 5525524 A	17-11-92 11-10-92 09-03-94 28-07-94 10-12-93 11-06-96

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: le Internationale No

PCT/FR 97/01420

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/569 G01N33/552 G01N33/547 G01N33/58

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 02646 A (RES DEV FOUNDATION ; ASGARI MORTEZA (US); PRASHAD NAGINDRA (US); CU) 3 février 1994 cité dans la demande voir page 4, ligne 14 - ligne 18 voir page 5, ligne 9 - ligne 11 voir page 9, ligne 1 - ligne 4 voir page 22, ligne 28 - ligne 30; revendications 1,4,5,47 ---	1-7, 10-30
Y	EP 0 396 116 A (ABBOTT LAB) 7 novembre 1990 cité dans la demande voir le document en entier --- -/-	1-30

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*S\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05. 11. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cartagena y Abella, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den 1 Internationale No  
PCT/FR 97/01420

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 94 02830 A (CANCER RES INST ;GREAVES MELVYN (GB); PRICE CATHERINE MARY (GB); C) 3 février 1994 cité dans la demande voir revendications 1,5,8,11 ---	1-30
Y	WO 96 03632 A (UNIV COLUMBIA) 8 février 1996 cité dans la demande voir page 1, ligne 19 - ligne 34 voir page 13, ligne 15 - ligne 32; revendications 1,2,9-11,15 ---	1-30
A	WO 92 21769 A (ABBOTT LAB) 10 décembre 1992 voir page 14, ligne 39 - page 20, ligne 14 voir page 23, ligne 12 - ligne 21 ---	1-9
A	WO 93 07486 A (PARTICULIERE DE SAINT CYR SOC) 15 avril 1993 cité dans la demande voir page 15, ligne 5 - ligne 12 & FR 2 682 481 A ---	1,6
A	WO 92 18868 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 29 octobre 1992 voir revendications 36,37 -----	8,9

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document International No

PCT/FR 97/01420

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9402646 A	03-02-94	AU 4685593 A	14-02-94
		CA 2140278 A	03-02-94
		EP 0662152 A	12-07-95
		JP 7509136 T	12-10-95
		US 5629147 A	13-05-97
-----			
EP 0396116 A	07-11-90	CA 2015938 A	02-11-90
		DE 69029873 D	20-03-97
		DE 69029873 T	07-08-97
		ES 2099699 T	01-06-97
		JP 2304364 A	18-12-90
		US 5399501 A	21-03-95
-----			
WO 9402830 A	03-02-94	AUCUN	
-----			
WO 9603632 A	08-02-96	US 5648222 A	15-07-97
		AU 3154295 A	22-02-96
-----			
WO 9221769 A	10-12-92	EP 0586590 A	16-03-94
		JP 6508210 T	14-09-94
-----			
WO 9307486 A	15-04-93	FR 2682481 A	16-04-93
		AU 2893792 A	03-05-93
-----			
WO 9218868 A	29-10-92	AU 1772992 A	17-11-92
		CA 2107894 A	11-10-92
		EP 0585310 A	09-03-94
		JP 6506688 T	28-07-94
		NO 933581 A	10-12-93
		US 5525524 A	11-06-96
-----			